

5/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013406560

WPI Acc No: 2000-578498/200054

XRAM Acc No: C00-172174

Porous polymer scaffolds with very high surface area for use in tissue culture, both in vivo and in vitro

Patent Assignee: UNIV RUTGERS STATE NEW JERSEY (RUTF)

Inventor: KOHN J B; LEVENE H B; LHOMMEAU C M

Number of Countries: 087 Number of Patents: 010

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week | |
|---------------|------|----------|---------------|------|----------|--------|---|
| US 6103255 | A | 20000815 | US 99293118 | A | 19990416 | 200054 | B |
| WO 200062829 | A1 | 20001026 | WO 99US8375 | A | 19990416 | 200056 | N |
| AU 9935663 | A | 20001102 | AU 9935663 | A | 19990416 | 200107 | N |
| | | | WO 99US8375 | A | 19990416 | | |
| US 6337198 | B1 | 20020108 | US 99293118 | A | 19990416 | 200211 | |
| | | | US 2000604945 | A | 20000627 | | |
| EP 1173235 | A1 | 20020123 | EP 99917575 | A | 19990416 | 200214 | N |
| | | | WO 99US8375 | A | 19990416 | | |
| JP 2002541925 | W | 20021210 | WO 99US8375 | A | 19990416 | 200301 | N |
| | | | JP 2000611965 | A | 19990416 | | |
| MX 2001010530 | A1 | 20020401 | WO 99US8375 | A | 19990416 | 200367 | N |
| | | | MX 200110530 | A | 20011016 | | |
| AU 768478 | B | 20031211 | AU 9935663 | A | 19990416 | 200404 | N |
| EP 1173235 | B1 | 20040512 | EP 99917575 | A | 19990416 | 200431 | N |
| | | | WO 99US8375 | A | 19990416 | | |
| DE 69917339 | E | 20040617 | DE 99617339 | A | 19990416 | 200446 | N |
| | | | EP 99917575 | A | 19990416 | | |
| | | | WO 99US8375 | A | 19990416 | | |

Priority Applications (No Type Date): US 99293118 A 19990416; WO 99US8375 A

19990416; AU 9935663 A 19990416; US 2000604945 A 20000627; EP 99917575 A

19990416; JP 2000611965 A 19990416; MX 200110530 A 20011016; DE 99617339

A 19990416

Patent Details:

| Patent No | Kind | Lan | Pg | Main IPC | Filing Notes |
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|

| | | | | | |
|------------|---|--|----|-------------|--|
| US 6103255 | A | | 10 | A61F-002/00 | |
|------------|---|--|----|-------------|--|

| | | | | | |
|--------------|----|---|--|-------------|--|
| WO 200062829 | A1 | E | | A61L-027/00 | |
|--------------|----|---|--|-------------|--|

Designated States (National): AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN

CU CZ DE DK EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ

LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK

SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR

IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ UG ZW

| | | | | |
|------------|---|--|-------------|------------------------------|
| AU 9935663 | A | | A61L-027/00 | Based on patent WO 200062829 |
|------------|---|--|-------------|------------------------------|

| | | | | |
|------------|----|--|-------------|--------------------------------|
| US 6337198 | B1 | | C12N-011/00 | Div ex application US 99293118 |
|------------|----|--|-------------|--------------------------------|

Div ex patent US 6103255

EP 1173235 A1 E A61L-027/00 Based on patent WO 200062829
 Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
 LI
 LU MC NL PT SE
 JP 2002541925 W 35 A61L-027/00 Based on patent WO 200062829
 MX 2001010530 A1 A61L-027/00 Based on patent WO 200062829
 AU 768478 B A61L-027/00 Previous Publ. patent AU 9935663
 Based on patent WO 200062829
 EP 1173235 B1 E A61L-027/00 Based on patent WO 200062829
 Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
 LI
 LU MC NL PT SE
 DE 69917339 E A61L-027/00 Based on patent EP 1173235
 Based on patent WO 200062829

Abstract (Basic): US 6103255 A

NOVELTY - Use of porous polymers (I) having a highly interconnected

bimodal distribution of open pores with smaller rounded pores aligned

within the walls of the large pores in tissue culture is new.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for a

method of preparing biodegradable and biocompatible porous bimodal polymer scaffolds (I) involving:

(a) dissolving 0.5-25 wt% of a biocompatible polymer in a miscible

solvent mixture of a solvent (II) in which the polymer is soluble

and a

solvent (III) in which the polymer is insoluble such that the ratio of

(II)/(III) is in the range in which the polymer will dissolve to form a

homogeneous solution and (II) has a melting point between -40 degrees

Celsius and 20 degrees Celsius;

(b) placing the solution into a mould containing water-soluble non-toxic particles (IV) that are insoluble in organic solvents and have a diameter of 50- 500 microns;

(c) quenching the solution at a rate such that the crystallisation

of the first solvent occurs before the onset of liquid-liquid

demixing

of (II) and (III);

(d) sublimating the polymer to remove the solvents;

(e) leaching the polymer with a solvent in which the particles are

soluble and the polymer is insoluble; and

(f) drying the polymer.

USE - (I) are useful as supports for tissue culture either in the

laboratory or at the site of a patient wound. They are highly porous,

having high interconnectivity between the pores, and have a specific

pore surface area in excess of 10 m squared/g. They are biocompatible

and biodegradable and have pores interconnected in such a way that three-dimensional tissue production is possible, the scaffold operating

to mimic the extracellular matrices (ECM) of the body.

ADVANTAGE - (I) behaves both as a physical support and an adhesive

substrate for isolated cells. As the transplanted cell populations grow

and the cells begin to function normally, they begin to secrete their

own ECM. The scaffold is designed to start to degrade as the need for

an artificial support diminishes.

pp; 10 DwgNo 0/0

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - ORGANIC CHEMISTRY - Preferred Materials:

(II) is

preferably 1,4-dioxan and (III) is water. The ratio between (II) and

the total solvent volume is preferably 1-40% v/v. The water-soluble particles (IV) are alkaline metal or alkaline earth metal halides, phosphates or sulfates; sugar crystals, water-soluble polymer microspheres or protein microspheres. Particularly preferred are sodium

chloride crystals.

POLYMERS - Preferred Materials: The polymers for use in (I) are preferably biodegradable and biocompatible polycarbonates, polyarylates, block copolymers of poly(alkylene oxides) with polycarbonates or polyarylates, alpha-hydroxycarboxylic acids, poly(carprolactones), poly(hydroxybutyrates), polyanhydrides, poly(orthoesters), polyesters and bisphenol-A based poly(phosphoesters).

Preferred Method: The quenching step is preferably effected by immersion of the solution in liquid nitrogen, and the leaching step utilizes water as the leaching agent. The scaffold structure may optionally comprise a biologically active substance which promotes

or

prevents growth of a particular variety of cellular tissue ingrowth, or

a pharmaceutically active compound.

Title Terms: POROUS; POLYMER; SCAFFOLDING; HIGH; SURFACE; AREA; TISSUE; CULTURE; VIVO; VITRO

Derwent Class: A96; B07; D16; D22; P34

International Patent Class (Main): A61F-002/00; A61L-027/00; C12N-011/00

International Patent Class (Additional): C08J-009/26; C08J-009/28; C08L-087-00; C12N-011/02; C12N-011/04; C12N-011/08

File Segment: CPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): A09-A07; A12-V02; B04-C03; B04-F02; B11-C04; B12-M02; B14-N17B; D05-H08; D09-C01

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M781 M905 Q110 RA00I9-K RA00I9-U

Polymer Indexing (PS):

<01>

001 018; P0862 P0839 F41 F44 D01 D63; S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605

002 018; P0851 P1978 P0839 H0293 F41 D01 D18 D63; S9999 S1309-R;
 S9999
 S1627 S1605
 003 018; P0975-R P0964 F34 D01 D10; H0044-R H0011; H0260; P0862
 P0839
 F41 F44 D01 D63; S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605
 004 018; P0975-R P0964 F34 D01 D10; H0044-R H0011; H0260; P0851
 P1978
 P0839 H0293 F41 D01 D18 D63; S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605
 005 018; G2108-R D01 D60 F35; P0839-R F41 D01 D63; H0000; H0011-R;
 S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605
 006 018; R01295 G2131 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D77 D86 F43; P0839-R
 F41
 D01 D63; P0055; H0000; H0011-R; S9999 S1309-R; S9999 S1627
 S1605
 007 018; P0782 F39 D01 D65; S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605
 008 018; P8059 D01 F24 F34; S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605
 009 018; R24028 P0599 D01 D11 D10 D50 D63 D84 F41; S9999 S1309-R;
 S9999
 S1627 S1605
 010 018; P0839-R F41 D01 D63; S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605
 011 018; D63 F53; R00470 G1161 G1150 G1149 G1092 D01 D11 D10 D19
 D18
 D32 D50 D76 D93 F32 F30; P0000; H0011-R; S9999 S1309-R; S9999
 S1627
 S1605
 012 018; G1263 G1149 G1092 D01 D18 D76 F32 F30 D11 D10 D19 D32 D50
 D63
 D94 F08 F07 F89 F41 F93 F70; P0862 P0839 F41 F44 D01 D63;
 H0011-R;
 S9999 S1309-R; S9999 S1627 S1605
 013 018; ND01; Q9999 Q8048 Q7987; B9999 B5221 B4740; B9999 B4488
 B4466;
 B9999 B4477 B4466; B9999 B5630 B3510 B3372; B9999 B3452-R
 B3372;
 N9999 N6860 N6655; N9999 N5823 N5812; N9999 N6780-R N6655;
 B9999
 B3021 B3010
 014 018; R01057 G1592 D01 D23 D22 D31 D46 D50 D76 D84 F34; R01740
 G2335
 D00 F20 H- O- 6A; A999 A475; A999 A771
 015 018; D00 D61-R D70 1A-R 7A-R; R01706 D00 D70 Na 1A Cl 7A; A999
 A395
 ; B9999 B5209 B5185 B4740; S9999 S1456-R; B9999 B3521-R B3510
 B3372
 016 018; D00 D61-R D70 2A-R 7A-R; A999 A395; S9999 S1456-R; B9999
 B3521-R B3510 B3372
 017 018; D00 D61-R F53 1A-R P- 5A O- 6A; A999 A395; S9999 S1456-R;
 B9999 B3521-R B3510 B3372
 018 018; D00 D61-R F53 2A-R P- 5A O- 6A; A999 A395; S9999 S1456-R;
 B9999 B3521-R B3510 B3372
 019 018; D00 D61-R F60 1A-R O- 6A S-; A999 A395; S9999 S1456-R;
 B9999
 B3521-R B3510 B3372
 020 018; D00 D61-R F60 2A-R O- 6A S-; A999 A395; S9999 S1456-R;
 B9999
 B3521-R B3510 B3372

021 018; R00135 D01 D10 D11 D22 D23 D32 D42 D50 D75 D76 D92 F24 F26
F29

F34; A999 A395; S9999 S1456-R; B9999 B3521-R B3510 B3372

<02>

001 018; A999 A395; A999 A782; P0000; S9999 S1456-R

002 018; G3714-R P0599 D01 F70; A999 A395; A999 A782; S9999 S1456-R

003 018; B9999 B3521-R B3510 B3372

Specific Compound Numbers: RA00I9-K; RA00I9-U

Key Word Indexing Terms:

01 184613-0-0-0-CL, USE

?

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-541925

(P2002-541925A)

(43) 公表日 平成14年12月10日 (2002. 12. 10)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード* (参考) |
|---------------------------|-------|---------------|-----------------|
| A 6 1 L 27/00 | | A 6 1 L 27/00 | Y 4 C 0 8 1 |
| C 0 8 J 9/26 | C E Z | C 0 8 J 9/26 | C E Z 4 F 0 7 4 |
| // C 0 8 L 87:00 | Z B P | C 0 8 L 87:00 | Z B P |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2000-611965 (P2000-611965)
 (86) (22) 出願日 平成11年4月16日 (1999. 4. 16)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年10月16日 (2001. 10. 16)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 0 8 3 7 5
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 6 2 8 2 9
 (87) 国際公開日 平成12年10月26日 (2000. 10. 26)

(71) 出願人 ラトガーズ, ザ ステイト ユニバーシテ
 イ
 RUTGERS, The State U
 niversity
 アメリカ合衆国、ニュージャージー
 08901、ニューブラウンスウィック、サマ
 セットストリート オールドクイーンズ
 (番地なし)

(72) 発明者 コーン、ヨアヒム ペー、
 アメリカ合衆国 08904 ニュージャージ
 ー州 ハイランド パーク ブルックデー
 ル コート 58

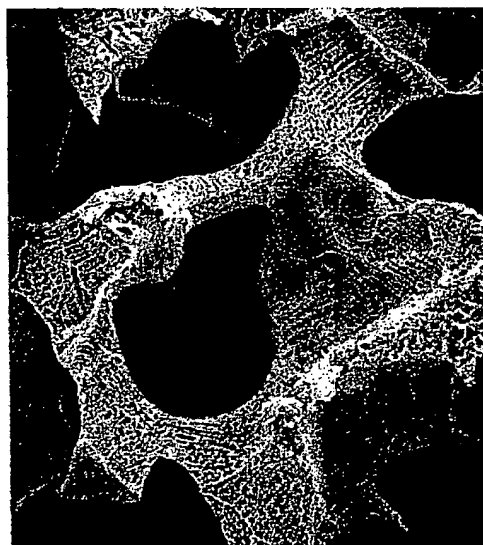
(74) 代理人 井理士 恩田 博宣 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織工学用多孔質ポリマー足場

(57) 【要約】

生体分解性および生体適合性多孔質足場は、径が約50～約500ミクロンの円形大孔および径が20ミクロン未満の円形小孔を有する開放孔径の高度に相互連結された二様式分布を有する実質的に連続的なポリマー相を有することを特徴とし、小孔が大孔の壁内に規則的に直線的に配列されている。ポリマー性組織足場の製造方法も開示されている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 径が約50～約500ミクロンの円形開放大孔および径が20ミクロン未満の円形開放小孔から成る高度に相互連結された二様式分布を有する実質的に連続的なポリマー相を有することを特徴とする生体分解性および生体適合性多孔質足場であって、前記小孔が前記大孔の壁内に規則的に直線的に配列されている足場。

【請求項2】 有孔度が約90%を超えることをさらなる特徴とする請求項1に記載の足場。

【請求項3】 比孔表面積が約10m²/gを超えることをさらなる特徴とする請求項1に記載の足場。

【請求項4】 前記ポリマーが水に不溶であるが、水混和性溶媒に可溶であることを特徴とする請求項1に記載の足場。

【請求項5】 前記ポリマーが、生体適合性および生体分解性のポリカーボネート類、ポリアリーレート類、ポリカーボネート類とポリ（アルキレンオキサイド）類とのブロック共重合体、ポリアリーレート類とポリ（アルキレンオキサイド）類とのブロック共重合体、 α -ヒドロキシカルボン酸類、ポリ（カプロラクトン）類、ポリ（ヒドロキシブチレート）類、ポリ無水物類、ポリ（オルトエステル）類、ポリエステル類およびビスフェノールAに基づくポリ（ホスホエステル）類からなる群から選択されることを特徴とする請求項4に記載の足場。

【請求項6】 前記ポリマーが、特定の各種細胞または組織内部成長を促進または防止する有効量の生理活性物質を含むことを特徴とする請求項1に記載の足場。

【請求項7】 前記ポリマーが有効量の医薬活性化合物を含むことを特徴とする請求項1に記載の足場。

【請求項8】 前記足場が、肝細胞、膵臓島細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、外分泌細胞、腸起源の細胞、胆管細胞、上皮小体細胞、甲状腺細胞、副腎一視床下部一下垂体軸の細胞、心筋細胞、腎臓上皮細胞、腎臓尿細管細胞、腎臓基底膜細胞、神経細胞、血管細胞、骨および軟骨を形成する細胞、平滑筋細胞、筋骨格細胞、眼球細胞、外皮細胞、角質細胞および幹細胞からなる群から選

択される細胞を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の足場。

【請求項 9】 前記細胞が培養組織細胞であることを特徴とする請求項 8 に記載の足場。

【請求項 10】 ポリマー基質上での細胞付着、移動および増殖方法であって、生きた細胞、生きた組織または生きた細胞を含む生体液を請求項 1 に記載の足場と接触させることを特徴とする方法。

【請求項 11】 生体分解性および生体適合性多孔質ポリマー足場の製造方法であって、

約 0.5 ～ 約 25 重量%の生体適合性ポリマーをそのポリマーが可溶である第 1 の溶媒とそのポリマーが不溶である第 2 の溶媒との混和性溶媒混合液に溶かす工程であって、前記第 2 の溶媒に対する前記第 1 の溶媒の比が、前記ポリマーが溶解して均一溶液を形成する範囲にあり、第 1 の溶媒が約 -40℃ ～ 約 20℃ の範囲の融点を有する工程；

前記ポリマー溶液を、有機溶媒に不溶であって約 50 ～ 約 500 ミクロンの径を有する水溶性で無毒性の粒子の入った型に入れる工程；

前記溶液を、前記第 1 および第 2 の溶媒の液-液脱混合開始前に前記第 1 の溶媒の結晶化を生じさせるのに効果的な速度で急冷する工程；

前記ポリマーを昇華して前記第 1 及び第 2 の溶媒を除去する工程；

前記粒子が可溶であり前記ポリマーが不溶である溶媒で前記ポリマーを浸出して、前記粒子を前記ポリマーから除去する工程；ならびに

前記ポリマーを乾燥する工程

から成ることを特徴とする方法。

【請求項 12】 前記溶媒全量に対する前記第 1 の溶媒の比が約 1 体積% ～ 約 40 体積%であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 前記第 1 の溶媒が 1,4-ジオキサンであり、前記第 2 の溶媒が水であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】 前記ポリマーが、生体適合性および生体分解性のポリカーボネート類、ポリアリーレート類、ポリカーボネート類とポリ（アルキレンオキサイド）類とのブロック共重合体、ポリアリーレート類とポリ（アルキレンオキ

サイド)類とのブロック共重合体、 α -ヒドロキシカルボン酸類、ポリ(カプロラクトン)類、ポリ(ヒドロキシブチレート)類、ポリ無水物類、ポリ(オルトエステル)類、ポリエステル類およびビスフェノール-Aに基づくポリ(ホスホエステル)類からなる群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項15】 前記粒子が、アルカリ金属およびアルカリ土類金属ハロゲン化物、リン酸塩および硫酸塩、砂糖結晶、水溶液ポリマーミクロスフィア、並びにタンパク質ミクロスフィアからなる群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項16】 前記粒子が塩化ナトリウム結晶であることを特徴とする請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記急冷工程が、液体窒素中への前記溶液の浸漬を含むことを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項18】 前記ポリマーを水で浸出することを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項19】 請求項11の方法によって製造されるポリマー性組織足場。

【請求項20】 前記ポリマーが、特定の種類の細胞組織内部成長を促進または防止する有効量の生理活性物質を含むことを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項21】 前記ポリマーが、有効量の医薬活性化化合物を含むことを特徴とする請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、組織工学および組織誘導再生において有用な生体分解性多孔質ポリマー足場（scaffold）に関する。詳しくは、本発明は、高度の相互連結性、大きな内部表面積、および大きな孔の壁に沿って直線的に配列された複数の孔を与える、開放孔径の二様式分布を有する生体分解性多孔質ポリマー足場に関するものである。本発明はさらに、前記足場を製造して秩序的な二様式孔分布を得る方法に関するものでもある。

【0002】

(背景技術)

分解性の合成ポリマー足場が、組織再生および修復の新たな手段として提案されている。そのような足場はインビトロ培養およびその後のインビボ埋め込み時における単離細胞の物理的支持体および付着基質の両方として役立つ。足場は、細胞を身体の所望の部位に配置し、改変組織用の空間を区画形成し、組織発達プロセスを誘導するのに利用される。足場上での細胞移植が、各種生体材料および合成材料を用いて、皮膚、神経、肝臓、脾臓、軟骨および骨組織の再生用に研究されている。

【0003】

別のアプローチでは、細胞をインビトロで事前に培養せずに、分解性ポリマー足場を患者に直接埋め込む。その場合には最初に細胞を含まない足場を、周囲の生きた組織に由来する細胞がその足場に付着し、足場の中に移動して、足場内部で機能性組織を形成するように設計する必要がある。

【0004】

組織工学足場の製造には、各種の合成生体分解性ポリマーを利用することができる。ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリ（乳酸）（PLA）およびそれらの共重合体が、組織工学で最も一般的に使用される合成ポリマーである。しかしながら基本的には、無毒性の分解生成物を生じる生体分解性ポリマーであればいかなるものも使用可能である。組織工学基質としてのポリマーの利用可能性は主

として、それを用いて3次元足場を容易に作製できるか否かによって決まる。従って、高度に相互連結された多孔質網目構造を有する多孔質足場を製造する処理方法を開発することが、重要な研究分野となっている。

【0005】

分解性ポリマー足場作製に最も広く用いられる方法の一つに溶媒注型法がある (Mikos et al., Polymer, 35, 1068-77 (1994); de Groot et al., Colloid Polym. Sci. 268, 1073-81 (1991); Laurencin et al., J. Biomed. Mater. Res., 30, 133-8 (1996) 参照)。米国特許5, 514, 378号には、ポリマー溶液を塩結晶床上に注ぐ基本手法が開示されている。塩結晶はその後、浸出プロセスで水によって溶解除去される。デグルート (De Groot) らは、共溶媒を加えることで、液-液脱混合によって冷却時の系の相分離を誘発する浸出法の変法を開示している。この分離機構によって、ポリマー基質内に包埋された円形孔が形成されるが、ほとんどの孔の大きさが、浸出によって形成された相対的に大きい孔間に高度に相互連結された網目構造を形成するには不十分である。

【0006】

既存の製造方法では、特に米国特許5, 514, 378号に開示されている方法などの基本的浸出法を用いる場合には、相互連結性の低い不十分な足場が生じる。ポリマー溶液に粒子を分散させると、粒子は溶液によって完全に取り囲まれるために、足場内の孔の相互連結性が制限される。

【0007】

米国特許5, 686, 091号には、スピノーダル分解が可能な条件下でポリマーの溶媒溶液を注型し、次に鑄型中のポリマー溶液の急冷と溶液からの溶媒昇華を行うことで生体分解性多孔質ポリマー足場を製造する方法が開示されている。均一な孔分布が開示されている。二様式孔分布では、孔間に別のチャンネルを形成して全体的な有孔度および表面積を高めることで、孔の相互連結性の程度が高まると考えられる。

【0008】

米国特許5, 723, 508号には、ポリマーの乳濁液、そのポリマーが溶ける第1の溶媒、および第1の溶媒と混和性である第2のポリマーを形成し、次に

乳濁液の破壊やポリマーの溶液からの分離が起こらない条件下で乳濁液を凍結乾燥することで生体分解性多孔質ポリマー足場を製造する方法が開示されている。しかしながらこの方法でも、より均一な孔径分布が得られ、孔の大半の径が9～35ミクロンの範囲にある。

【0009】

現在でもなお、高度に相互連結された孔の網目構造を提供する二様式孔径分布を有する組織工学用生体分解性多孔質ポリマー足場、ならびにそのような足場を製造することができる方法が必要とされている。さらに進んだ科学的根拠によれば、二様式孔径分布を有するポリマー足場はかなりの利点を有する可能性がある。孔径範囲が50～500ミクロンである孔は、足場内での機能性組織の形成に十分な開放空間を提供し、大孔間にチャンネルを形成するかなり多数の小孔が存在することで、細胞と細胞の接触、細胞への栄養素および酸素の拡散、細胞からの代謝老廃物の除去、ならびに細胞を誘導する表面パターンが増加するものと考えられる。分解性ポリマー足場についてのこの新たな設計概念では、孔径が50～500ミクロンの大孔と、その大孔間にチャンネルを形成する小孔とが存在する二様式孔径分布が存在することが必要とされる。

【0010】

(発明の開示)

この要件は本発明によって満足され、相分離と浸出法を組み合わせることで、新規な組織工学用構造を有するポリマー足場の作製を可能とする方法が提供される。

【0011】

本発明の1態様によれば、円形の大孔径および小孔径の高度に相互連結された二様式分布を有し、大孔が約50～約500ミクロンの径を有し、小孔が20ミクロン未満の径を有する実質的に連続的なポリマー相を有する生体分解性および生体適合性多孔質足場であって、小孔が大孔の壁内に規則的に直線的に配列されている足場が提供される。大孔間にチャンネルを形成する小孔が存在することで、孔の相互連結性は大きく高められる。それによって、有孔度が約90%超となり、比孔表面積が $10\text{ m}^2/\text{g}$ を超える高いものとなる。

【0012】

小孔の網目構造は大孔の壁に形成され、予想に反して直線的な配列に良好に配向している。これによって、足場全体にわたって細胞成長を誘導する表面パターンが提供される。この特定の構造によって、細胞接種、細胞成長および細胞外基質形成に理想的な、大きい表面積および内部容量も得られる。さらに、孔が高度に相互連結されていることで、足場全体における孔の分布、足場を通る細胞間シグナル伝達分子の移動、構造全体での栄養素の拡散、ならびに細胞成長を誘導する表面のパターン形成が可能となる。孔径と相互連結構造が、血管形成および組織内部成長には重要である。

【0013】

3次元構造の開放有孔性によって拡散が促進され、血管の内部成長が埋め込み足場内に伸びることができる。理想的には、ポリマーは時間が経つと完全に吸収されて、新たに形成された組織のみが残る。

【0014】

本発明のポリマー足場は、生体分解性ポリマーが可溶である第1の溶媒および該ポリマーが不溶である第2の溶媒とは混和性である第2の溶媒の混合液に溶解させたそのポリマーの均一溶液から製造される。その均一溶液を、径が約50～約500ミクロンの水溶性粒子上に注ぎ、低温での急冷および凍結乾燥とそれに続く浸出によって相分離する。孔径の二様式分布は、浸出によって大孔が形成され、ポリマーが可溶である溶媒の相分離時の結晶化によって小孔が形成されることで生じる。

【0015】

従って本発明の別の態様によれば、生体分解性および生体適合性多孔質ポリマー足場の製造方法であって、生体適合性ポリマーをそのポリマーが可溶である第1の溶媒およびそのポリマーが不溶である第2の溶媒の混和性溶媒混合液に溶解させるものであり；第2の溶媒に対する第1の溶媒の比が、前記ポリマーが溶解して均一溶液を形成する範囲にあり；前記第1の溶媒が約-40℃～約20℃の範囲の融点を有する方法が提供される。次に前記均一溶液を、有機溶媒に不溶であって約50～約500ミクロンの径を有する水溶性で無毒性の粒子の入った型

に入れる。次にその溶液を、ポリマー溶液の液-液脱混合が生じる前に第1の溶媒の結晶化を生じさせる上で効果的な速度で急冷する。次に、溶媒をポリマー相から昇華させてから、粒子は可溶であるがポリマーが不溶である溶媒を用いる浸出によって粒子を除去する。

【0016】

粒子表面で第2の溶媒存在下に第1の溶媒が結晶化することで、直線的な微小構造が生じるものと考えられている。それによって、表面積が大きく、内部容量の大きい高度に多孔性の足場発泡体が得られる。

【0017】

本発明の上記および他の目的、特徴、利点については、添付の図面を参照しながら、下記に述べた好ましい実施態様についての詳細な説明から、さらに理解を深めることができる。

【0018】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明は、熱誘発相分離を用いて、組織工学用に最適な特性を有する高度に多孔質の生体分解性足場を作製する。熱力学、動力学および冷却速度に応じて、相分離は溶媒結晶化によって起こるか、液-液脱混合によって起こる。本発明は、二様式孔径分布を有していることで高度の孔相互連結性と大孔壁内での高度に直線配置された小孔構造とを与える多孔質ポリマー足場を得る上での相分離機構として溶媒結晶化が支配的となるような溶媒および処理条件を用いる。

【0019】

液-液脱混合が起こる前に溶媒結晶化を生じさせるには、溶媒および処理条件の選択が非常に重要である。2種類の溶媒の混合液であって、一方の溶媒がポリマー可溶であり（明瞭を期するため「第1の溶媒」と称する）、他方がポリマー不溶である（明瞭を期するため「第2の溶媒」と称する）ものを用いる。第1の溶媒と第2の溶媒は混和性でなければならず、ポリマーが第2の溶媒中で不溶であっても、そのポリマーが可溶となる混合液を形成するものでなければならない。ポリマー、第1の溶媒および第2の溶媒の量は、均一溶液を与えるように選択する。

【0020】

第1の溶媒は、約 -40°C ～約 20°C の融点を持たなければならない。この範囲内では、冷却速度が大きいと、結晶化が優先的な相分離機構となる。約 -20°C ～約 $+20^{\circ}\text{C}$ の融点が好ましい。これらの要件を理想的に満足する溶媒は1, 4-ジオキサンである。それは融点が 12°C であり、結晶化エネルギーが低い。

【0021】

特定の理論に拘束されるものではないが、結晶化は核形成剤として働くと考えられる第2の溶媒によって開始すると考えられる。第2の溶媒としての使用に好適なポリマーが不溶である溶媒には、水やメタノール、エタノール、イソプロパノール、tert-ブタノールおよび1, 3-プロパンジオールなどの（これらに限定されるものではない）アルコール類などがある。溶媒混合液中でポリマーが可溶であることが必須である。

【0022】

第1および第2の溶媒の最も好ましい組合せは、1, 4-ジオキサンと水からなるものである。冷却速度が大きいと、1, 4-ジオキサンの結晶化が優先して起こると考えられている。さらに、結晶化の核形成剤として作用すると考えられる水によって、1, 4-ジオキサンの結晶化が開始されると考えられている。

【0023】

組織工学用足場に用いられるポリマーは、細胞の付着基質として作用し、細胞成長を促進し、分化細胞の機能の保持を可能とする以外に、生体適合性かつ生体分解性でなければならない。そのような材料はまた、大きい表面/体積比、機械的強度、および例えば骨代替物用などの複雑な形状への容易な加工を可能とする物理的特性を有するものでなければならない。得られたポリマー装置はまた、インビボ条件下で所望の形状を維持するだけの剛性を持つものでなければならない。

【0024】

本発明での使用に好適なポリマーは、実質的に生体分解性であり、無毒性であり、生理的に適合性である。ポリマーは埋め込み時の生体適合性で選択しなければならず、その分解プロセスの産物も生体適合性でなければならない。重要な

役割を果たす別のパラメータには、材料の機械的特性、特に機械的剛性などがある。剛性が比較的高ければ、足場内で成長している細胞によって加えられる収縮力に足場が耐えることができることため有利である。さらに重要な点は温度特性、特にガラス転移温度 T_g である。ガラス転移温度 T_g は、足場における孔の網目構造が溶媒除去時に崩壊しない程度に高くなくてはならない。ポリマーの生体分解動態が治癒プロセスの速度に適合することも重要である。

【0025】

好適なポリマーの例としては α -ヒドロキシカルボン酸類およびその共重合体、例えばPGA、PLAおよびそれらの共重合体；リードらが開示している (Reed et al., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, p.109 (1977)) ポリエチレンオキサイド/ポリエチレンテレフタレート；乳酸もしくはグリコール酸またはそれら2種類の組合せとヒドロキシ末端可撓性鎖、好ましくは米国特許4, 826, 945号に開示されている各種分子量のポリ(アルキレングリコール)類との共重合体などがある。他の好適なポリマーには、生体分解性および生体適合性のポリカプロラクトン類、ポリヒドロキシブチレート類ならびにポリエステル類、ポリカーボネート類、ポリ無水物類およびポリ(オルトエステル)類の共重合体などがある。

【0026】

ビスフェノール-Aをベースとしたポリリン酸エステル類も、生体分解性足場設計での使用に向けて提案されている。そのようなポリマーには、ポリ(ビスフェノール-Aフェニルホスフェート)、ポリ(ビスフェノール-Aエチルホスフェート)、ポリ(ビスフェノール-Aエチルホスフェート)、ポリ(ビスフェノール-Aフェニルホスフェート)、ポリ[ビス(2-エトキシ)ヒドロホスホニックテレフタレート]およびビスフェノール-Aをベースとしたポリ(ホスホエステル)類の共重合体などがある。これらのポリマーは米国特許5, 686, 091号で提案されているが、ビスフェノール-Aには細胞毒性があることが知られていることから、埋め込み用の候補としてはあまり好ましくない。他方、別の有用なポリマー系として、ポリエチレンオキサイド/ポリエチレンテレフタレートの共重合体がある。

【0027】

本発明の実施において特に好ましいポリマーは、チロシン由来ジフェノール化合物のポリマーである。チロシン由来ジフェノールモノマーの製造方法は米国特許5,587,507号および同5,670,602号に開示されており、それらの開示内容はいずれも参照により本明細書に含まれるものとする。好ましいジフェノールモノマーはデスーアミノチロシルーチロシン(DT)エステル類である。このモノマーは、懸垂鎖を結合させるのに使用することができる遊離カルボン酸基を有する。通常、各種アルキルエステル懸垂鎖が用いられる。本発明に関して、そのエチルエステルをDTEと称し、ブチルエステルをDTBと称し、ヘキシルエステルをDTHと称し、オクチルエステルをDTOと称し、ベンジルエステルをDTBuと称する等の呼称を用いる。

【0028】

チロシン由来ジフェノール化合物は、ポリカーボネート類、ポリイミノカーボネート類、ポリアリーレート類、ポリウレタン類、ポリエーテル類などのモノマー原料として用いられる。ポリカーボネート類、ポリイミノカーボネート類および製造方法については米国特許5,099,060号および同5,198,507号に開示されており、それらの開示内容は参照により本明細書に含まれるものとする。ポリアリーレート類および製造方法は米国特許5,216,115号に開示されており、その開示内容も参照により本明細書に含まれるものとする。ポリカーボネートおよびポリアリーレートとポリ(アルキレンオキサイド)とのブロック共重合体および製造方法は米国特許5,658,995号に開示されており、その開示内容も参照により本明細書に含まれるものとする。厳密に交互配列されたポリ(アルキレンオキサイドエーテル)共重合体および製造方法は1998年11月6日出願の国際出願PCT/US98/23737に開示されており、その開示内容も参照により本明細書に含まれるものとする。

【0029】

他の特に好ましいポリマーには、ポリカーボネート類、ポリイミノカーボネート類、ポリアリーレート類、ポリウレタン類、厳密に交互配列されたポリ(アルキレンオキサイドエーテル)類、ならびに α -、 β -および γ -ヒドロキシ酸お

よびチロシン誘導体から製造されるジヒドロキシモノマーから重合したポリ（アルキレンオキシド）ブロック共重合体などがある。そのジヒドロキシモノマーの製造および重合方法は国際特許出願PCT/US98/036013に開示されており、その開示内容も参照により本明細書に含まれるものとする。

【0030】

ヨウ素原子を有するか遊離カルボン酸懸垂鎖を有するポリカーボネート類、ポリイミノカーボネート類、ポリアリーレート類、ポリ（アルキレンオキシド）ブロック共重合体ならびにジフェノールとジヒドロキシチロシンモノマーのポリエーテル類も用いることができる。含ヨウ素ポリマーは放射線不透過性である。これらのポリマーおよび製造方法は、1998年11月6日出願の国際特許出願PCT/US98/23777に開示されている。遊離カルボン酸懸垂鎖を有するポリマーおよび製造方法は、1998年4月7日出願の米国特許出願09/56050号に開示されている。これら両出願の開示内容も、参照により本明細書に含まれるものとする。

【0031】

組織工学用生体分解性足場の製造方法においては、最初にポリマーを混和性溶媒混合液に溶かす。第2の溶媒の量は、冷却時に相分離を誘発する上で有効であるが、その手順を開始する前に相分離を誘発する上で有効な量より少ない量でなければならない。溶媒全量に対する第1の溶媒の容量比は、好ましくは約1～約40体積%、より好ましくは約5～約15体積%である。

【0032】

溶媒混合液中のポリマー濃度は、好ましくは約0.5～約25重量%、より好ましくは約10～約20重量%である。溶媒中のポリマー濃度は、粒子を通してポリマー溶液が十分に拡散することで大孔が形成されるように選択しなければならない。

【0033】

粒子は、本質的に、水には容易に可溶であるが有機溶媒には不溶な、無毒性で生体適合性の結晶性物質である。好適な粒子の例としては、生理的に許容されるアルカリ金属およびアルカリ土類金属のハロゲン化物、リン酸塩、硫酸塩などが

ある。砂糖の結晶や、さらには水溶性ポリマーまたはアルブミンなどのタンパク質のミクロスフィアも用いることができる。塩化ナトリウムが特に好ましい粒子である。粒子の選択は、二様式の粒径分布の大径に望ましい直径を有するように行わなければならない。約50～約500ミクロンの粒径を有する粒子が好ましく、約200～約400ミクロンの粒径がより好ましい。

【0034】

ポリマーと溶媒の溶液を、約50～約500ミクロンの所望の粒径となるまで篩にかけた粒子上に注ぐ。粒子は、ディッシュなどの適切な鋳型に入れておく。

ポリマー溶液が粒子を通して拡散した後、ポリマー溶液の液-液脱混合が起こる前に第1の溶媒の結晶化を誘発する上で有効な速度で、ディッシュの内容物を急冷する。例えば、ディッシュを液体窒素中またはそれと同等の低温液に入れ、液体窒素に入れた状態に維持して、系の急速かつ完全な急冷を行うことができる。

【0035】

次に、溶媒を完全に昇華させるのに必要な時間にわたり、真空ポンプにつながった容器にディッシュを入れる。この工程によって、冷凍物からの昇華による溶媒除去が可能となることから、多孔質構造が残る。この系はまだ冷凍状態とし、溶媒除去時にポリマーが弛緩しないようにする。

【0036】

最後に粒子を、粒子が可溶であってポリマーが可溶である溶媒（例えば第2の溶媒）で、またはより好ましくは第2の溶媒として用いるか否かとは無関係に水で、浸出する。浸出溶媒を数回変えることで、粒子が完全に除去されるようにする。得られる足場を浸出溶媒から取り出し、乾燥させて一定量とする。

【0037】

この方法によって、大孔径と小孔径の二様式分布が得られる。大孔は、ポリマー溶液を注型した際の粒子の痕跡である。前述のように、大孔は約50～約500ミクロンの平均孔径を有する。小孔は、ポリマー溶液について冷却下での相分離を行う際に形成され、平均径は約20ミクロン未満である。本発明による好ましい方法は、平均粒径が約10ミクロン未満の小孔を与える。大孔の形状は、水

が無溶媒である場合にポリマー溶液に水を加えることで平滑化することができる。

【0038】

得られる足場の有孔度は、約90%より大きい。本発明の好ましい方法は、有孔度が95%を超える足場発泡体を提供する。その足場は $10\text{ m}^2/\text{g}$ を超える比孔表面積を有し、好ましい方法によって $20\text{ m}^2/\text{g}$ を超える比孔表面積が得られる。

【0039】

足場は、作製後にさらに変えることができる。例えば、所望の細胞群に対する受容体または化学誘引物として機能する生理活性物質で足場をコーティングすることができる。そのコーティングは、吸収または化学結合によって施すことができる。

【0040】

特に好ましい足場には、後に徐々に放出される添加剤が組み込まれる。その添加剤は、ポリマー相の生理侵食によって、あるいはポリマー相の拡散によって放出させることができる。別法として、添加剤を、それが活性となる足場構造のポリマー表面まで移動させてもよい。

【0041】

ポリマーならびに第1および第2の溶媒は、添加剤をそれに溶かす前に予め混合することができる。別法として、添加剤をそれが最もよく溶ける溶媒に溶かしてから、第1および第2の溶媒ならびにポリマーを混合することができる。

【0042】

添加剤は、生理的に許容される担体、賦形剤、安定剤などに入った状態で提供することができ、徐放製剤で提供することができる。添加剤にはさらに、抗体、抗体フラグメント、成長因子、ホルモンその他の添加剤が結合する標的部分などの、添加剤の送達を促進する作用物質を加えることもできる。

【0043】

治療用に許容される医薬用担体は製薬業界で公知であり、例えばレミングトンの著作 (Remington, Pharmaceutical Science, Mac Publishing Co., (A. R. Gen

naro edt. 1985))に記載されている。そのような材料は、使用される用量および濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、希釈剤；可溶化剤；潤滑剤；懸濁剤；包埋材；溶媒；増粘剤；分散剤；リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩および他の有機酸塩などの緩衝剤；アスコルビン酸などの酸化防止剤；保存剤；ポリアルギニンなどの低分子量（残基約10個未満）ペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリ（ビニルピロリジノン）などの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンなどのアミノ酸；セルロースもしくはその誘導体、グルコース、マンノースまたはデキストリン類などの単糖類、二糖類および他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの対イオン；および／またはTwee n、プルロニック類（pluronic s）もしくはPEGなどの非イオン性界面活性剤などがある。

【0044】

添加剤は、懸垂遊離カルボン酸基を有するポリマーに共有結合的に結合させることができる。ポリマー結合遊離カルボン酸基への各種部分の結合のための詳細な化学的手順については、文献に記載されている。例えば、米国特許5, 219, 564号および同5, 660, 822号；Nathan et al., Bio. Cong. Chem., 4, 54-62 (1992)およびNathan, Macromolecules, 25, 4476 (1992)を参照する。これら両特許および両雑誌論文の開示内容は、参照により本明細書に含まれる。これら刊行物は、懸垂遊離カルボン酸基を有するポリマーを反応性官能基を有する部分、あるいは活性官能基を有するよう誘導体化された部分と反応させてポリマー結合体を形成する手順を開示している。

【0045】

添加剤が結合体型で活性の場合には、加水分解に対して安定な結合体を利用する。添加剤が結合体型で不活性の場合には、加水分解可能な結合体を利用する。

ある量の添加剤を多孔質ポリマー足場に組み込んで、処置を必要とする患者、特に哺乳動物に対して最適な効力を得るようにする。投与の用量および方法は患者ごとに変わる可能性があり、治療を受ける哺乳動物の種類、その性別、体重、食事、併用薬剤、全体的な臨床的状态、使用する特定の化合物、その化合物を

用いる具体的な用途、ならびに当業者には明らかな他の要素などの要素によって決まる。多孔質ポリマー足場は、ヒトなどの霊長類、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ラットおよびマウスなどの哺乳動物における組織工学用および組織誘導再生用の足場としてインビボで、あるいはインビトロで利用することができる。本発明のポリマー-薬剤の組合せは、薬剤活性の保持に適した条件下での保存用に、さらにはポリマーの完全性維持用に製造することができ、一般には室温または冷蔵温度での保存に好適である。組織工学および組織誘導再生に用いられる多孔質ポリマー足場はまた、無菌でなければならない。滅菌は、放射線照射あるいはガス処理または加熱などの従来の方法によって容易に行うことができる。

【0046】

本発明での使用に好適な添加剤には、生理的または医薬的に活性化化合物などがある。生理活性化化合物の例には、細胞付着に影響することが知られている各種「RGD」インテグリン結合配列を有するペプチドなどの細胞付着介在物質、生理活性リガンド、ならびに特定の種類の細胞または組織の内部成長を促進または妨害する物質などがある。そのような物質には例えば、骨形態発生タンパク質（BMP）のような骨誘発物質、上皮成長因子（EGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、インシュリン様成長因子（IGF-IおよびIGF-II）、TGF- β などがある。

【0047】

医薬活性化化合物の例としては、例えばアシクロビル、セフラジン、マルファレン、プロカイン、アドリオマイシン、ダウノマイシン、プルンバギン、アトロピン、キニーネ（quinine）、ジゴキシン、キニジン、生理活性ペプチド類、コリン_{e6}、セファロチン、プロリンおよびシス-ヒドロキシー-L-プロリンなどのプロリン類縁体、ペニシリンV、アスピリン、イブプロフェン、ステロイド類、ニコチン酸、ケモデオキシコリン酸、クロラムブチルなどがある。治療上有効な用量は、インビトロまたはインビボでの方法によって決定することができる。各特定の添加剤に関して個別に決定を行って、必要な最適用量を決定することができる。有効用量レベル、すなわち所望の結果を得るのに必要な用量レベルの決定

は、当業者の裁量の範囲内である。さらに、添加剤の放出速度を当業界の通常の技術の範囲内で変動させて、処置すべき治療状態に応じて有利なプロファイルを決定することができる。

【0048】

代表的な添加剤用量は、約0.001mg/kg～約1000mg/kg、好ましくは約0.01mg/kg～約100mg/kg、より好ましくは約0.10mg/kg～約20mg/kgの範囲になる。添加剤は単独で用いてもよいし、あるいは他の治療薬または診断薬と組み合わせて使用してもよい。

【0049】

本発明の多孔質ポリマー足場は、走査型電子顕微鏡検査（SEM）および水銀多孔度測定法によって特性決定する。以下に具体例を示す。

多孔質ポリマー足場は、組織工学および再建手術などの組織誘導再生の分野の物に成形される。足場の構造によって大量の細胞内部成長が可能となつて、細胞の前接種の必要性がなくなる。多孔質ポリマー足場はまた、外部支持臓器を形成するためのインビトロ培養における支持体用の外部土台を形成するよう成形することもできる。

【0050】

足場は、身体の細胞外基質（ECM）を模倣する機能を有する。足場は、インビトロ培養時およびその後の埋め込み時の単離細胞における物理的支持体および付着基質の両方として役立つ。移植細胞群が成長し、細胞が正常に機能するにつれて、それらはそれ自体のECM支持体を分泌し始める。足場ポリマーは、人工的支持体が消失するにつれて分解するよう選択される。

【0051】

軟骨および骨などの構造組織の再建では、組織形状は機能する上で非常に重要であり、多孔質ポリマー足場を各種の厚さおよび形状の物に成形する必要がある。鋸、メス、レーザー光または他のいずれかの切断具を用いて基質の一部を除去することで、3次元構造で所望の間隙、開口または微細構造を形成することができる。足場の利用例には、神経、筋骨格、軟骨、腱、肝臓、脾臓、眼球、皮膚、動静脈、泌尿器または中実または中空の器官を形成する他の任意組織等の組織の

再生などがある。

【0052】

足場はさらに、軟骨細胞または肝細胞などの解離細胞用の基質として移植で用いて、3次元の組織または器官を形成することもできる。任意の種類の細胞を足場に加えて、培養および恐らくは埋め込みを行うことができ、それには軟骨細胞、線維芽細胞、筋細胞および骨細胞などの筋・骨格系の細胞；肝細胞、脾臓細胞（脾島細胞など）などの実質細胞；腸起源の細胞；神経細胞および皮膚細胞などの他の細胞などがあり、それらは提供者から、確立された細胞培養系から、あるいは遺伝子操作前後に、入手することができる。同じ構造中で多くの異なる細胞種を提供することができる組織片も用いることができる。

【0053】

細胞は、好適な提供者、あるいは埋め込みされるべき患者から入手し、標準法を用いて解離し、発泡体足場上およびその足場内に接種する。適宜に、インビトロ培養を行ってから、埋め込みを行うことができる。別法として、発泡体足場を埋め込み、血管形成させ、次に細胞を足場に注入する。インビトロでの細胞培養の方法および試薬ならびに組織足場の埋め込みは当業者には周知である。

【0054】

(産業上の利用可能性)

本発明の多孔質ポリマー足場は、組織工学および再建手術などの組織誘導再生分野用の有用物へと作製することができる。足場はまた、外部支持臓器の形成のためのインビトロでの細胞培養の支持体用の外部足場を形成するよう成形することもできる。足場はまた、解離細胞用基質として移植に用いることもできる。

【0055】

以下に記載の実施例は本発明のある種の態様を説明するものであり、本発明を限定するものではない。「部」および「パーセント」はいずれも、別段の断りがない限り重量基準であり、温度はいずれも摂氏単位である。

【0056】

実施例

実施例1～6：各種ポリマーからの足場の製造

多孔質足場を表1に示したポリマーから製造した。

表1

【0057】

【表1】

| | Mw (ダルトン) | ポリマー濃度 g/L |
|----------------------------|-----------|---------------|
| ポリ(DTE カーボネート) | 206000 | 60.6 |
| ポリ(DTE カーボネート) | 89000 | 92.7 |
| ポリ(DTE co 30%DT カーボネート) | 96000 | 87.6 |
| ポリ(DTE co 5%PEG 1K カーボネート) | 88000 | 74.5 |
| ポリ(DTB サクシネート) | 108000 | 90.7 |
| ポリ(L-乳酸) | 93000 | 91.5 |

実施例1：ポリ(DTE c) 足場の製造

材料：

米国特許5,099,060号に開示の方法を用いてポリ(DTEカーボネート)($M_w=206,000$)を製造した。1,4-ジオキサン(証明済みACSグレード)および塩化ナトリウム($NaCl$)結晶をフィッシャー・サイエンティフィック(Fisher Scientific, ペンシルベニア州ピッツバーグ(Pittsburgh)所在)から購入した。結晶を、開口が $212\mu m$ (n_170)および $425\mu m$ (n_140)の米国標準試験篩(ASTM-E11, Tyler, オハイオ州メンター(Mentor)所在)を用いて篩った。多孔度測定試験に用いた水銀は、3回蒸留品(Bethlehem Apparatus, ペンシルベニア州ヘラータウン(Hellertown)所在)であった。

【0058】

足場作製：

以下の処理法によって足場を製造した。

ポリ(DTEカーボネート)0.2gを、室温で磁気攪拌下に1,4-ジオキサン3mLおよび水0.3mLの混合液に溶かした。ポリマー溶解後に得られた透明溶液を、適切なディッシュに入った篩にかけた塩化ナトリウム塩(平均径：約 $200\mu m$ ～約 $400\mu m$)7gに注ぎかけた。

【0059】

塩床を通してポリマー溶液が拡散した後、ディッシュを液体窒素に沈め、その状態に維持して系を完全凍結させた。次に、溶媒を完全に昇華させて多孔質構造を残すのに必要な期間にわたって、真空ポンプに連結された容器にディッシュを入れた。ポリマーは溶媒除去時に弛緩しなかった。

【0060】

最後に、塩を水中に浸出させた。感受性硝酸銀検査で水中へのそれ以上の塩素イオン放出が示されなくなるまで、水を数回交換した。得られた足場を水から取り出し、数日乾燥させて恒量とした。

【0061】

SEM走査型電子顕微鏡検査：

SEMを行って、足場の形態を評価した。液体窒素（-196℃）中での足場の凍結切断によって、SEM用にサンプルを製造した。凍結切断は、湿サンプルについて行った。足場について一連の加圧-除圧を行って、孔が水で充填されるようにした。足場から気泡が発生しなくなり、サンプルがパイアルの底に沈んだ時点で、それを液体窒素に沈めた。

【0062】

次に、サンプルを十分に真空乾燥し、粘着性タブを用いて金属スタブに乗せた。それについて、バルザース（Balzers）SCD004スパッタコーティング装置（BAL-TEC）を用いて銀コーティングした。ガス圧は3~5 Pa（ $3 \sim 5 \times 10^{-2}$ ミリバール）に設定し、電流は120秒間のコーティング時間において30mAとした。検査には15kVの日立S450SEMを用いた。

【0063】

画像解析：

SEMによって得られたデジタル画像の孔径を、NIHイメージ（NIH Image）1.6ソフトウェアを用いて解析した。孔面積、周囲長さ、楕円の長軸および短軸を、評価対象の画像パラメータとした。孔評価に先だって、デジタル画像の調節を行う必要があった。全画像について同等の調節が行われるようにするため、検査対象の孔径に用いた画像スケールに従ってパスカルマクロ（Pascal macro）を書いた。

【0064】

番号を施した孔を実際のデジタル画像と比較して、孔の位置を確認した。適切に表示されなかった一定の孔数は、統計データ解析から除外した。各足場について、2種類の倍率（低倍率（200 μm のスケールバー）および高倍率（10 μm のスケールバー））で3種類のデジタル画像を解析した（ $n=3$ ）。

【0065】

水銀多孔度測定：

乾燥足場は、総有孔率が高く、ポリマー係数が低いことから、非常に柔軟で、容易に変形させることができた。さらに、平均径が約300 μm （塩の最終痕跡）を有するものと予想された最大孔は、この方法では過小評価されていたと考えられる。そのため、足場の分析は塩がポリマー基質内にまだある時に行った。

【0066】

9540型水銀多孔度計（Micromeritics, ジョージア州ノークロス（Norcross）所在）を用いて、各種圧力での足場中への水銀侵入容量を記録することで、孔体積および孔径分布を求めた。充填圧は、約20.7 MPa（3000 psi）まで記録した。この圧力は、0.06 μm 以上の孔に水銀を侵入させるのに必要なエネルギーに相当する。孔径および有孔度の値は、径が310 μm より小さい同等の円筒形孔に関係する。

【0067】

これらの値は、下記のウォッシュバーン式から求めた。

$$D = - (1/P) 4 \gamma \cos \phi$$

式中、Dは孔径（ μm ）であり；Pは加えた圧力（psi）であり； γ は水銀と足場表面の間の表面張力であり（ダイン/cm）； ϕ は接触角（度）である。

【0068】

表面張力および接触角についての推奨値は、 $\gamma = 485$ ダイン/cm、 $\phi = 130^\circ$ である。

結果は、平均孔径計算値の関数での増加水銀侵入量（mL/g）の曲線として

提供される。各足場について、サンプルの試験は3連で行った（ $n=3$ ）。

【0069】

結果の考察：

表11：ポリ（DTEカーボネート）足場についてのSEM画像解析からの結果

【0070】

【表2】

| | 面積 (μm^2) | 周囲長 (μm) | 最大軸長 (μm) | 最小軸長 (μm) |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| スケール:10 μm | | | | |
| 平均 | 47 | 30 | 9 | 5 |
| 標準偏差 | 14 | 5 | 2 | 0 |
| スケール:200 μm | | | | |
| 平均 | 49,554 | 1077 | 300 | 191 |
| 標準偏差 | 7,279 | 54 | 21 | 20 |

ポリ（DTEカーボネート）足場は、各種プロセスから得られる開放孔径の二様式分布によって特性決定される（図1）。平均孔径200 μm ～400 μm の最大孔は、溶液を注型した際の塩の痕跡である。平均孔径が20 μm 未満である最小孔は、ポリマー溶液について冷却下に相分離を行う際に形成される。最小孔は、最大孔の壁上と、最大孔間のポリマー相に認められる。

【0071】

孔の網目構造は、高度に相互連結されている。水銀多孔度測定からの興味深い所見は、最小孔自体が高度に相互連結されているという点である。最大孔が測定のためにNaClによって充填されているにも拘わらず、比較的高い圧力をかけた場合に、最小孔のほとんどにそれが達することが可能であるように思われる。さらに、最大孔間の相互連結性は、最大孔間にチャンネルを形成する最小孔の存在によって促進される。得られる足場の有孔度は90%を超える。最大孔の壁に形成される小孔の網目構造は、驚くほど良好に直線的に配列されている。

【0072】

実施例2：低分子量ポリ（DTEカーボネート）足場の製造

総比表面積を評価し、有孔度を推定するために、低分子量ポリ（DTEカーボ

ネット) から足場を製造した。

材料：

実施例1と同様にしてポリ(DTEカーボネート)($M_w = 89,000$)を製造した。

【0073】

足場作製：

低分子量ポリ(DTEカーボネート) 0.3 gを1,4-ジオキサンおよび水(91/9体積%)の溶液に溶かした。この溶液を用いて実施例1と同様にして足場を作製した。

【0074】

BET測定：総比表面積測定：

クオインタソルブ(Quantasorb, Quantachrome, フロリダ州ボイントンビーチ(Boynton Beach))を利用するブルナウアーエロメットーテラー(Brunauer-Eromett-Teller)(BET)法を用いて、比表面積を調べた。このBET装置は、表面上に吸着された窒素の量を計算することで、サンプルの総比表面積を測定するものである。

【0075】

有孔度推定：

大孔径を有する足場(本試験で用いたものと同様)では、Hg多孔度計では有孔度が過小評価される。有孔度のより正確な測定は、各サンプルの重量、高さおよび径を測定することで可能である。これらの測定値から、足場の見かけの密度(ρ^*)を計算することができ、有孔度(ϵ)は下記式によって求められる。

【0076】

$$\epsilon = 1 - \rho^* / \rho_{PDTEC}$$

式中、 ρ_{PDTEC} ポリマー密度である(1.2778)。

結果：

ポリ(DTEカーボネート)足場の総孔表面積は、ほぼ $20 \text{ m}^2/\text{g}$ であった。この値は、PLLAのナフタレン溶液を噴霧することで製造される足場について報告されている値(水銀多孔度測定によって得たもの)の10倍高い値であっ

た。この値は、PLGAの塩化メチレン溶液から乳濁液法によって製造された足場について報告の値 ($16 \sim 99 \text{ m}^2/\text{g}$) (水銀多孔度測定によって得たもの) の範囲内であるが、平均径は $50 \mu\text{m}$ より低い。推定有孔度は 97% であった。

【0077】

実施例3：ポリ(DTE co 30%DTカーボネート)足場の製造

本実施例では、実施例1に示した方法を用いて、遊離酸共重合体であるポリ(DTE co 30%DTカーボネート)から足場を製造する。

材料：

1997年11月7日出願の米国特許出願09/056,050号(その開示内容は参照により本明細書に含まれる)に開示の方法を用いて、ポリ(DTE co 30%DTカーボネート) ($M_w = 960,000$) を製造した。

【0078】

足場作製：

ポリ(DTE co 30%DTカーボネート) 0.289 g を1,4-ジオキサン/水(91/9体積%)に溶かした。この溶液を用いて実施例1と同様に足場を作製した。

【0079】

SEM、水銀多孔度測定および画像解析：

ポリ(DTE co 30%DTカーボネート)足場を、実施例1のポリ(DTEカーボネート)足場と比較した。

結果：

SEM画像解析と水銀多孔度測定結果から、ポリ(DTEカーボネート)およびポリ(DTE co 30%DTカーボネート)から製造された足場は同様の孔径分布を与えることができる。2つの足場間に有意差は認められなかった。足場を特性決定するのに用いられる方法の観点からすると、ポリマー溶液の粘度を制御することで、ポリ(DTEカーボネート)およびポリ(DTE co 30%DTカーボネート)から同様の孔径分布を有する足場を製造することが可能である。

【0080】

実施例4：ポリ（DTE co 5%PEG1000カーボネート）足場の製造

本実施例では、実施例1に示した方法を用いて、PEGおよびポリ（DTEカーボネート）の共重合体であるポリ（DTE co 5%PEG1000カーボネート）から足場を製造する。

【0081】

材料：

米国特許5,658,995号に開示の方法を用いて、ポリ（DTE co 5%PEG1000カーボネート）（ $M_w=88,0000$ ）を製造した。

足場作製：

ポリ（DTE co 5%PEG1000カーボネート）0.246gを1,4-ジオキサン／水（91／9体積%）3.3mLに溶かした。この溶液を用いて、実施例1と同様にして足場を作製した。

【0082】

SEM、水銀多孔度測定および画像解析：

ポリ（DTE co 5%PEG1000カーボネート）足場を、実施例1のポリ（DTEカーボネート）足場と比較した。

結果：

SEM画像解析と水銀多孔度測定結果から、ポリ（DTEカーボネート）およびポリ（DTE co 5%PEG1000カーボネート）から製造された足場は同様の孔径分布を与えると言うことができる。2つの足場間に有意差は認められなかった。足場を特性決定するのに用いられる方法の観点からすると、ポリマー溶液の粘度を制御することで、ポリ（DTEカーボネート）およびポリ（DTE co 5%PEG1000カーボネート）から同様の孔径分布を有する足場を製造することが可能である。

【0083】

実施例5：ポリ（DTBサクシネート）足場の製造

本実施例では、実施例1に示した方法を用いて、ポリカーボネートに代えてポリアリーレートから足場を製造する。ポリ（DTBサクシネート）は、実施例1

のポリ（DTEカーボネート）と比較してT_gが低いこと（65℃）を特徴とする。

【0084】

材料：

米国特許5,216,115号に開示の方法を用いて、ポリ（DTBサクシネート）（M_w=108,000）を製造した。

足場作製：

ポリ（DTBサクシネート）0.3gを1,4-ジオキサン／水（91／9体積％）3.3mLに溶かした。この溶液を用いて、実施例1と同様にして足場を作製した。

【0085】

SEM：

ポリ（DTBサクシネート）足場を、実施例1のポリ（DTEカーボネート）足場と比較した。

結果：

SEM所見から、ポリ（DTBサクシネート）足場は実施例1のポリ（DTEカーボネート）足場と同じ形態学的特徴を示している（実施例1の結果と考察参照）。

【0086】

実施例6：ポリ（L-乳酸）（PLLA）足場の製造

本実施例では、実施例1に示した方法を用いて、ポリカーボネートに代えてPLLAから足場を製造する。

足場作製：

PLLA（M_w=108,000）（Medisolv polymers, Alkermes Inc., オハイオ州シンシナチ（Cincinnati）所在）0.3gを1,4-ジオキサン／水（91／9体積％）に溶かした。この溶液を用いて、実施例1と同様にして足場を作製した。

【0087】

SEM：

PLLA足場を、実施例1のポリ（DTEカーボネート）足場と比較した。

結果：

SEM所見から、PLLA足場は実施例1のポリ（DTEカーボネート）足場と同じ形態学的特徴を示している（実施例1の結果と考察参照）。

【0088】

実施例7：水の量を増加させた溶液からの足場の製造

本明細書の方法を用いて試験を実施して、ポリマー溶液中の水の添加量を増やして多孔質足場の形態を最適化した。

足場作製：

実施例1のポリ（DTEカーボネート）0.3gを1,4-ジオキサン／水（85／15体積％）3.3mLに溶かした。この溶液を用いて、実施例1と同様にして足場を作製した。

【0089】

SEM：

この足場を、実施例1で製造した足場と比較した。

結果：

水は、1,4-ジオキサン結晶化プロセスにおいて核形成剤のように作用する。水は、ポリマー溶液を液体窒素中で急冷した際に溶媒結晶化の開始段階において核化密度を高める。核化密度が上昇すると、得られる結晶の大きさは常に小さくなる。これによって、水の割合を上昇させていくと、最大孔間で認められる微小構造が小さくなるということが説明できると考えられる。非常に小さい孔（平均直径が5μm未満）の体積割合は、溶液中の水分量に伴って上昇する。

【0090】

水を加えて、冷却下でのポリマー溶液の相分離を促進する。水の量が上昇すると、溶媒中でのポリマー溶解度が徐々に低下する。溶液を急冷すると、ポリマー溶液のL-L脱混合が誘発されるのが早くなる。核は形成量を多くすることができ、系が完全に凍結する前にポリマー基質中で成長することができる。そうして最終的な足場において、さらに多くの円形孔（L-L脱混合によって生じる）が存在するようになる。

【0091】

溶液中での水の存在は、溶液を注型するNaCl塩の溶解にも寄与する。水の割合が上昇するに連れて、最大孔の形状における変化が認められる。見かけ上では、このプロセスによってNaCl塩が侵食されていた。そのため、溶液中で水含有量が上昇するに連れて、最大孔間での相互連結性に大幅な上昇を本発明者らは認める。

【0092】

実施例8：足場中へのインビボ細胞成長

インビボの動物モデルで、高度の多孔質の足場を評価した。骨格が成熟した雄のニュージーランド白色ウサギ32匹に対して、頭蓋冠（頭蓋骨）の両側に足場を埋め込んだ。

【0093】

足場は実施例2に記載の方法に従って製造した。製造後、足場を真空乾燥し、滅菌パウチ中に封入し、アンプロレン（Anprolene）AN72C自動換気滅菌装置に入れてエチレンオキサイド曝露による滅菌を行った。滅菌後、サンプルを少なくとも2週間大気中で平衡状態として、エチレンオキサイドを確実に除去した。

【0094】

各手術において、完全滅菌法を用いてウサギの準備を行った。各手術で2個の埋込物を埋め込んだ。各埋込物は、2つの直径8mmの欠損部のうち的一方に入れた。

【0095】

埋め込んだ足場は直径8mmで厚さ2～3mmとすることで、ウサギの頭蓋冠の寸法に相当するようにした。足場には細胞の前接種は行わなかった。2週、4週、8週および16週後、足場を回収し、組織学的分析を行った。中間の時点で（例えば、4週間後の場合には2週間後）および屠殺前に、ウサギにオキシテトラサイクリンを注射して、骨の内部成長を標識した。サンプルを、70%、80%、95%および100%エタノールの水／アルコール溶液中で脱水し、組織清拭剤（FisherからのHemo-De）で清拭し、メタクリル酸メチル（Fisher）の重合

溶液中で固定して、サンプルをポリメタクリル酸メチルの固体ブロックに埋め込んだ。サンプルを水平方向および垂直方向に切って、水平方向および垂直方向の断面を得た。切片を乗せ、粉碎し、仕上げを行って、厚さが細胞1～3個分の層とした。サンプルを紫外線下に観察し、内部成長を分析した。次に、サンプルをスティーブネル・ブルー (Stevenel's blue) およびヴァン・ギーソンのピクロフスシンで染色した。そのような染色において、骨は赤であり、線維組織は青であり、類骨は緑であった。両方の染色において、サンプルの写真を撮影して、肉眼観察と画像解析を行うようにした。

【0096】

骨内部成長の深さを測定して、高度多孔質足場構造の効果を反映させ、以前の試験と比較した。その以前の試験では、1～10ミクロンの孔なしで製造した足場についてのデータが提供されている。その以前の足場は同じポリマーから形成したものであるが、急冷段階を行わずに浸出を行って、異なる溶媒を用いて形成したものである。

【0097】

3～4週間後に、2種類のスポンジ間で測定可能な差が認められた。高度に多孔質の足場の方が、大きい骨の内部成長量を示した。さらに、1～10ミクロンの孔の規則的配列が細胞配列に影響した。細胞は、孔が形成したパターンに配列しているのが認められた。細胞はさらに、そのパターンに沿って石化した。

【0098】

高度に多孔質の足場は、先行技術の種類の足場に関して予想されと考えられる以上に、細胞成長を促進し、細胞増殖を誘導したという点で、先行技術の足場より優れていた。

【0099】

実施例9：足場中へのインビボ細胞成長；比較試験

実施例8のウサギ頭蓋骨欠損モデルを用いたインビボの比較埋込試験で、新たな骨の足場中への成長を支持する能力について、2種類の異なる足場構造を比較した。この2種類の足場は孔径において均一であり（200～500ミクロン）、本発明で記載の二様式孔分布を有していた。足場は孔径分布以外の全ての面で

同一であったが、二様式分布を有する足場は骨治癒力が高かった。

【0100】

以上の実施例および好ましい実施態様の説明は、特許請求の範囲によって定義される本発明を例示するものであって、限定するものと解釈すべきではない。容易に理解されるように、特許請求の範囲に記載の本発明から逸脱しない限りにおいて、多くの変更および上記の特徴の組合せを利用することができる。そのような変更は、本発明の精神および範囲からの逸脱と見なされるものではなく、そのような変更は全て特許請求の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の方法によって製造された発泡体のSEM顕微鏡写真である。

【図1】

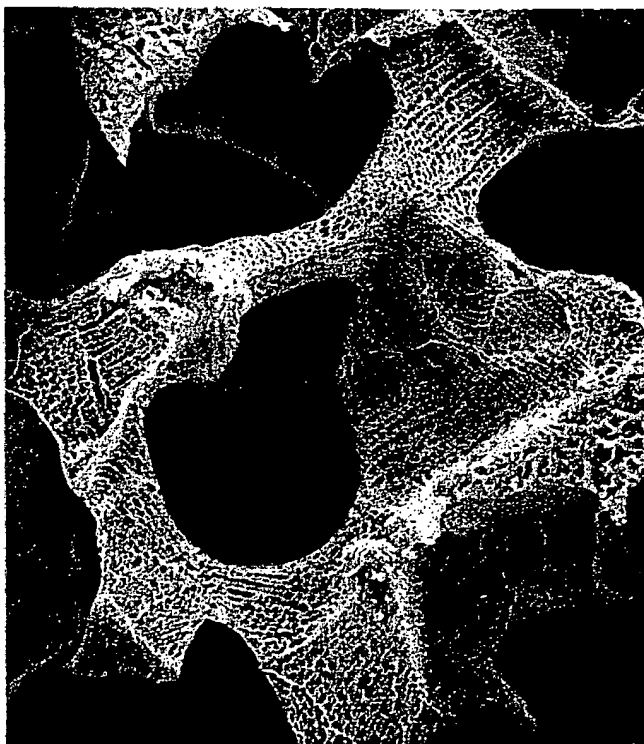


FIG. 1

International Application No.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols):

IPC 7 C08J A61L C12H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | US 5 856 367 A (SUSZKO PAUL R ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) | 1,2,5-21 |
| Y | column 2, line 28 - line 38 column 2, line 52 - column 3, line 46 column 8, line 34 - line 48 claims 1-12 | 1-21 |
| Y | WO 98 36013 A (KOHN JOACHIM B ; QIU BO (US); UNIV RUTGERS (US)) 20 August 1998 (1998-08-20) cited in the application the whole document | 1-21 |
| A | US 5 514 378 A (CIMA LINDA G ET AL) 7 May 1996 (1996-05-07) cited in the application figure 1 claims | 1-21 |

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

X Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

^T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"b" documents member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 1999

Date of mailing of the international search report

30/11/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5018 Patendijk 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 eponl,
Fax (+31-70) 340-8018

Authorized officer

Thornton, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 99/08375

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|------------------------|
| A | WO 99 09149 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY ; SHASTRI VENKATRAM R (US); MARTIN IV) 25 February 1999 (1999-02-25) claims | 1-10 |
| A | US 5 847 012 A (SHALABY SHALABY W ET AL) 8 December 1998 (1998-12-08) column 2, line 24 -column 3, line 47 column 4, line 64 -column 5, line 25 column 9, line 51 -column 10, line 8 claims | 1,2, 5-11, 16-19 |
| A | WO 97 45532 A (UNIV BROWN RES FOUND) 4 December 1997 (1997-12-04) example 1 claims | 1,5-11 |
| A | US 5 244 799 A (ANDERSON DAVID M) 14 September 1993 (1993-09-14) abstract column 7, line 32 - line 56 claims 1,4,7 | 1,2 |
| A | WO 98 44027 A (SHEA LONNIE ; UNIV MICHIGAN (US); HARRIS LEATRESE (US); MOONEY DAVI) 8 October 1998 (1998-10-08) page 3, line 19 - line 30 page 5, line 13 - line 16 page 7, line 17 - line 29 claims 18,19,22,23,25-36 | 1,2 |
| A | US 5 288 763 A (LI NAI-HONG ET AL) 22 February 1994 (1994-02-22) column 1, line 18 - line 21 column 3, line 17 -column 4, line 50 column 5, line 58 -column 6, line 11 column 6, line 31 - line 45 column 7, line 34 - line 43 table 1 figures 1-6 claims | 1 |
| A | EP 0 612 791 A (A H HIDES & SKINS AUSTRALIA PT) 31 August 1994 (1994-08-31) page 5, line 25 - line 34 page 14, line 36 - line 39 claims | 1 |

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No

PCT/US 99/08375

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| US 5856367 A | 05-01-1999 | US 5502092 A EP 0744969 A JP 9509082 T WO 9522360 A | 26-03-1996 04-12-1996 16-09-1997 24-08-1995 |
| WO 9836013 A | 20-08-1998 | AU 6173598 A AU 1391399 A WO 9924107 A AU 1386999 A AU 1519999 A WO 9924490 A WO 9924391 A | 08-09-1998 31-05-1999 20-05-1999 31-05-1999 31-05-1999 20-05-1999 20-05-1999 |
| US 5514378 A | 07-05-1996 | NONE | |
| WO 9909149 A | 25-02-1999 | AU 8681098 A | 08-03-1999 |
| US 5847012 A | 08-12-1998 | US 5898040 A US 5960020 A AU 7564494 A EP 0713364 A WO 9505083 A US 5677355 A | 27-04-1999 19-10-1999 14-03-1995 29-05-1996 23-02-1995 14-10-1997 |
| WO 9745532 A | 04-12-1997 | EP 0907721 A US 5939323 A | 14-04-1999 17-08-1999 |
| US 5244799 A | 14-09-1993 | AT 109371 T DE 3850915 D DE 3850915 T EP 0292325 A JP 1085233 A US 5238613 A AU 4951690 A AU 5021390 A WO 9007575 A WO 9007545 A CA 2045533 A | 15-08-1994 08-09-1994 09-03-1995 23-11-1988 30-03-1989 24-08-1993 01-08-1990 01-08-1990 12-07-1990 12-07-1990 15-09-1990 |
| WO 9844027 A | 08-10-1998 | AU 6786098 A | 22-10-1998 |
| US 5288763 A | 22-02-1994 | NONE | |
| EP 0612791 A | 31-08-1994 | WO 9321263 A DE 69218786 D DE 69218786 T JP 8508755 T US 5494939 A | 28-10-1993 07-05-1997 02-01-1998 17-09-1996 27-02-1996 |

Form PCT/ISN/10 (patent family search) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 レーベン、ハワード ビー.

アメリカ合衆国 08854-6220 ニュー
ジャージー州 ピスカタウェイ ハンプシ
ヤー コート 245

(72)発明者 ロモー、クリステル エム.

アメリカ合衆国 08904 ニュージャージ
ー州 ハイランド パーク フォレスト
グレン ドライブ 68

Fターム(参考) 4C081 BA12 BA16 CA152 CA161

CA172 CA181 CA201 CC02

CE02 DB03 DC03

4F074 AA65 AA70 CB03 CB13 CB14

CB22 CB27 DA03 DA53

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.